

**Ocorrência de Bactérias Diazotróficas
Endofíticas na Mandioca (*Manihot
esculenta* Crantz)**



República Federativa do Brasil

Luis Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Luís Carlos Guedes Pinto

Presidente

Sílvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Sílvio Crestana

Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Meio Ambiente

Paulo Choji Kitamura

Chefe Geral

Ladislau Araújo Skorupa

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Cristina Martins Cruz

Chefe-Adjunto de Administração

Ariovaldo Luchiari Junior

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1516-4675

Outubro, 2005

Boletim de Pesquisa 34 e Desenvolvimento

Ocorrência de Bactérias Diazotróficas Endofíticas na Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Manoel Araújo Teixeira
Itamar Soares de Melo
Rosana Faria Vieira

Jaguariúna, SP
2005

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - Km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 - Cep.13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750
Fax: (19) 3867-8740
www.cnpma.embrapa.br
sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Editoração da Unidade

Presidente: Ladislau Araújo Skorupa
Secretário-Executivo: Sandro Freitas Nunes
Bibliotecário: Maria Amélia de Toledo Leme
Membros: Cláudio César de Almeida Buschinelli; Heloisa Ferreira Filizola;
Manoel Dornelas de Souza; Maria Conceição Peres Young Pessoa; Marta
Camargo de Assis; Osvaldo Machado R. Cabral
Normalização Bibliográfica: Maria Amélia de Toledo Leme
Editoração eletrônica: Silvana Cristina Teixeira

1ª edição**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Teixeira, Manoel Araújo
Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz) / Manoel Araújo Teixeira, Itamar Soares
de Melo, Rosana Faria Vieira. – Jaguariúna : Embrapa Meio
Ambiente, 2005.

20 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Meio Ambiente, ISSN 1516-4675 ; 34).

1. Bactérias diazotróficas. 2. Mandioca. I. Melo, Itamar Soares
de. II. Vieira, Rosana Faria. III. Título. IV. Série.

CDD 631.847

©Embrapa 2005

Sumário

Resumo.....	6
Abstract.....	7
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	10
Conclusões.....	15
Referências Bibliográficas.....	16

Ocorrência de Bactérias Diazotróficas Endofíticas na Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Manoel Araujo Teixeira¹

Itamar Soares de Melo²

Rosana Faria Vieira³

Resumo

Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias endofíticas da mandioca com potencial para a fixação de N₂ atmosférico. Foram utilizados isolados bacterianos endofíticos de plantas de mandioca provenientes dos estados de São Paulo, Amazonas e Bahia. No estado de São Paulo as plantas foram coletadas em plantios comerciais nos municípios de Iêpe, Araras e Mogi Guaçu. No estado do Amazonas e da Bahia foram coletadas etnovarietades mantidas pelos índios e pequenos agricultores, nas regiões de Autazes e em Porto Seguro, respectivamente. O potencial para fixação do N₂ atmosférico foi avaliado pelo crescimento das bactérias em meio de cultura livre de N, pela atividade de redução do acetileno e pela presença do gene *nifH*.

Espécies bacterianas endofíticas com capacidade para crescer em meio de cultura livre de N foram encontradas nos três estados e foram classificadas dentro do subgrupo das γ -*Proteobacteria* e dos *Bacilli*. As amplificações por PCR do gene *nifH* foram realizadas em espécies bacterianas pertencentes às γ -*Proteobacteria*. Baseado no crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio e na presença do gene *nifH*, oito isolados bacterianos obtidos das plantas de mandioca foram selecionados para posteriores testes *in planta*.

¹ Biólogo, Doutor em Biotecnologia, Universidade do Vale do Sapucaí, Av. Prefeito Tuany Toledo, 470, Fátima I, Caixa Postal 213, 37.550-00, Pouso Alegre, MG. teixeira@cnpma.embrapa.br

² Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética, Núcleo de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5, Tanquinho Velho, Caixa Postal 69, 13.820-000, Jaguariúna, SP. itamar@cnpma.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, Doutora em Solos e Nutrição de Plantas, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5, Tanquinho Velho, Caixa Postal 69, 13.820-000 Jaguariúna, SP. rosana@cnpma.embrapa.br

Occurrence of Diazotrophic Endophytic Bacteria in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Abstract

The objective of this work was to isolate endophytic bacteria from cassava plants with N₂ fixation potential. Bacterial isolates of cassava plants from the states of São Paulo, Amazonas, and Bahia were used. In the State of São Paulo, plants were collected from commercial plantings in the municipalities of Iepê, Araras, and Mogi Guaçu. In the states of Amazonas and Bahia, ethnovarieties maintained by Indians were collected in the regions of Autazes and Porto Seguro, respectively. The atmospheric N₂ fixation potential was evaluated by means of bacterial growth in N-free culture medium, by the activity of acetylene reduction and by the presence of the *nifH* gene. Endophytic bacterial species capable of growing in N-free culture medium were found in the three states and were classified within the γ -*Proteobacteria* and *Bacilli* subgroups. PCR amplifications of the *nifH* gene were verified in bacterial species that belonged to the γ -*Proteobacteria* group. Based on bacterial growth in nitrogen-free culture medium and on the presence of the *nifH* gene, eight isolates obtained from cassava plants were selected for later use in *in planta* tests.

Introdução

As bactérias associadas às plantas são consideradas endofíticas quando habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Hallmann et al., 1997). A presença destas bactérias tem sido associada à promoção do crescimento de várias culturas incluindo tomate, pepino (Nowak et al., 1995), batata (Sturtz, 1995), batata doce (Reiter et al., 2003), dentre outras.

A promoção do crescimento das plantas por bactérias endofíticas pode ser resultante de ações indiretas, como por exemplo, a supressão de doenças, ou de ações diretas, como a produção de fitohormônios, fixação do N_2 atmosférico, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (Tan & Zou, 2001). O mecanismo de promoção do crescimento vegetal por endófitos é, portanto, um processo complexo, que pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

O suprimento adicional de nitrogênio para as plantas pelos endófitos diazotróficos seria uma forma direta que estes microrganismos utilizariam para promover o crescimento de diferentes culturas. O elemento nitrogênio é altamente abundante na atmosfera da terra, porém, a disponibilidade do N fixado é o fator mais limitante do rendimento em muitos sistemas de produção agrícola. Os químicos nitrogenados são responsáveis por mais de 30% dos fertilizantes totais necessários para as culturas agrícolas (Muthukumarasamy et al., 2002). Com o aumento do custo destes fertilizantes e com a crescente preocupação com os possíveis danos ambientais decorrentes de seu uso, o papel da fixação biológica do nitrogênio, em outras plantas que não as leguminosas, é de extrema importância para a condução sustentável da agricultura.

A fixação do nitrogênio por diazotróficos endofíticos tem sido raramente comprovada. Porém, alega-se que esses microrganismos têm uma vantagem sobre os diazotróficos associativos de raízes, uma vez que ocupam espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro e, portanto, com maior acesso às fontes de carbono. Além disso, eles colonizam nichos protegidos do oxigênio, o qual é necessário para a expressão e atividade da nitrogenase (Dobbelaere et al., 2003)

O presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias endofíticas isoladas de plantas de mandioca coletadas de diferentes regiões do Brasil, com potencial para fixação do N_2 atmosférico.

Material e Métodos

Isolamento das bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas foram isoladas de plantas de mandioca provenientes dos estados de São Paulo, Amazonas e Bahia. No estado de São Paulo as plantas foram coletadas em plantios comerciais nos municípios de Iêpe, Araras e Mogi Guaçu. No estado do Amazonas e Bahia foram coletadas etnovarietades mantidas pelos índios e pequenos agricultores, nas regiões de Autazes e de Porto Seguro, respectivamente.

O processo de eliminação da população epifítica e de outros microrganismos foi iniciado com a lavagem de todo o material coletado, com bucha e sabão. Raízes, caules e folhas foram desinfetados superficialmente utilizando-se os seguintes produtos químicos em ordem de descrição: álcool 70% (1'), hipoclorito de sódio 2% (6'), álcool 70% (30") e água destilada. Do material desinfetado foram retiradas as extremidades e o restante foi cortado em pequenos pedaços (0,5 – 0,7 cm), que foram distribuídos por toda superfície dos meios de cultura TSA e amido caseína (Teixeira, 2004). Ambos os meios de cultura foram suplementados com 1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do fungicida benomil. Para cada parte da planta (raiz, caule e folha) e, para cada planta, foram feitas três placas de cada meio de cultura, cada uma com sete pedaços do tecido vegetal. As placas foram incubadas em sala com temperatura ambiente entre 25°C e 27°C. A avaliação do crescimento bacteriano teve início após 48 h de incubação das placas e prosseguiu por um período de dez dias. Ao longo deste tempo as placas foram avaliadas a cada dois dias. As bactérias foram retiradas da "placa-mãe" e transferidas para outras placas com o mesmo meio de cultura. Colônias individuais foram purificadas por esgotamento (estrias) e conservadas em óleo mineral.

Identificação de bactérias com capacidade para fixar N_2 atmosférico

Crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio

Um total de duzentas e setenta bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de fixar N_2 atmosférico em meio de cultura sem fonte de nitrogênio. Para tal, as bactérias foram transferidas para 10 mL do meio de cultura Novo Fábio (NFb) (Döbereiner et al., 1995) e incubadas a 28°C, por 7 dias. Para cada isolado foram feitas duas repetições. Os resultados foram avaliados como positivos ou negativos, de acordo com a seguinte escala de nota: ++ = películas finas, claras e bem visíveis; + = películas bem delineadas, mas pouco visíveis; -/+ = películas bastante claras; - = ausência de película. O controle utilizado foi o *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Atividade de redução do acetileno

A atividade de redução do acetileno, *in vitro*, (Hungria et al., 1994) foi avaliada em bactérias que cresceram no meio de cultura livre de nitrogênio. Os isolados foram cultivados em tubos de "vacutainer" com 4 mL do meio de cultura NFb, semi-sólido, por quatro dias. Após este período foi injetado 10% (v/v) de acetileno em cada tubo. A quantidade de etileno foi quantificada 12 horas após a injeção do acetileno, em um Cromatógrafo a gás equipado com detector de chama e coluna Porapak, localizado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA- USP).

Extração do DNA genômico total e amplificação por PCR dos genes *nifH*

As bactérias que apresentaram crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio foram agrupadas segundo algumas características morfológicas e classificadas pelo método FAME. Cento e trinta e sete isolados foram assim obtidos para o teste de amplificação por PCR dos genes *nifH*. Os isolados foram cultivados em 10 mL de meio de cultura TSA líquido e incubados por 48 horas a 28°C, em 'shaker', a 120 g. As reações de amplificação (PCR) foram feitas conforme descritas por Ueda et al. (1995), utilizando o *primer* universal, 19f 5' GCINTYTAYGGIAARGGIGG3' e 407r 5' AAICCRCCRCIAIACIACRTC3', para os isolados pertencentes aos grupos das *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Para o grupo Bacilli as reações de amplificação foram descritas por Achoack et al., (1999), e o *primer* específico utilizado foi f 5'-GGAATTCTGTGATCCTAAAGCTGA-3' e r 5'-AGCATACATTGCCATCATTTACC-3'. Foram utilizados 5 mL da reação de PCR para a observação em gel de agarose (1,2%). Fragmentos de aproximadamente 370 pb foram esperados para o gene *nifH*.

Resultados e Discussão

A maior percentagem de bactérias endofíticas com capacidade para crescer em meio de cultura NFb foi obtida no estado do Amazonas, ou seja, 36,1%; este percentual foi 15,9% maior que o obtido no estado da Bahia, embora o número de bactérias tenha sido menos da metade do que o testado neste último estado (Figura 1). Na Bahia e em São Paulo, 20,2% e 32,3% dos isolados testados foram positivos quanto ao crescimento em NFb, respectivamente. A presença de bactérias diazotróficas em mandioca já havia sido anteriormente relatada por Balota et al. (1999). Apesar destes resultados as bactérias não expressaram atividade de redução do acetileno *in vitro*.

O complexo enzimático da nitrogenase depende de determinadas condições para que possa ser expressado. A ausência da planta ou mesmo a fonte e quantidade de carbono (C) utilizado no meio de cultura podem ter sido os fatores responsáveis pela ausência de

atividade daquela enzima. Gyaneshwar et al. (2001) relataram que a atividade de redução do acetileno em plântulas de arroz inoculadas com bactérias endofíticas foi dependente da adição de C ao meio de enraizamento. Balota et al. (1999) também relataram que a *Klebsiella pneumoniae* exige meio de cultura apropriado para expressar a atividade da nitrogenase.

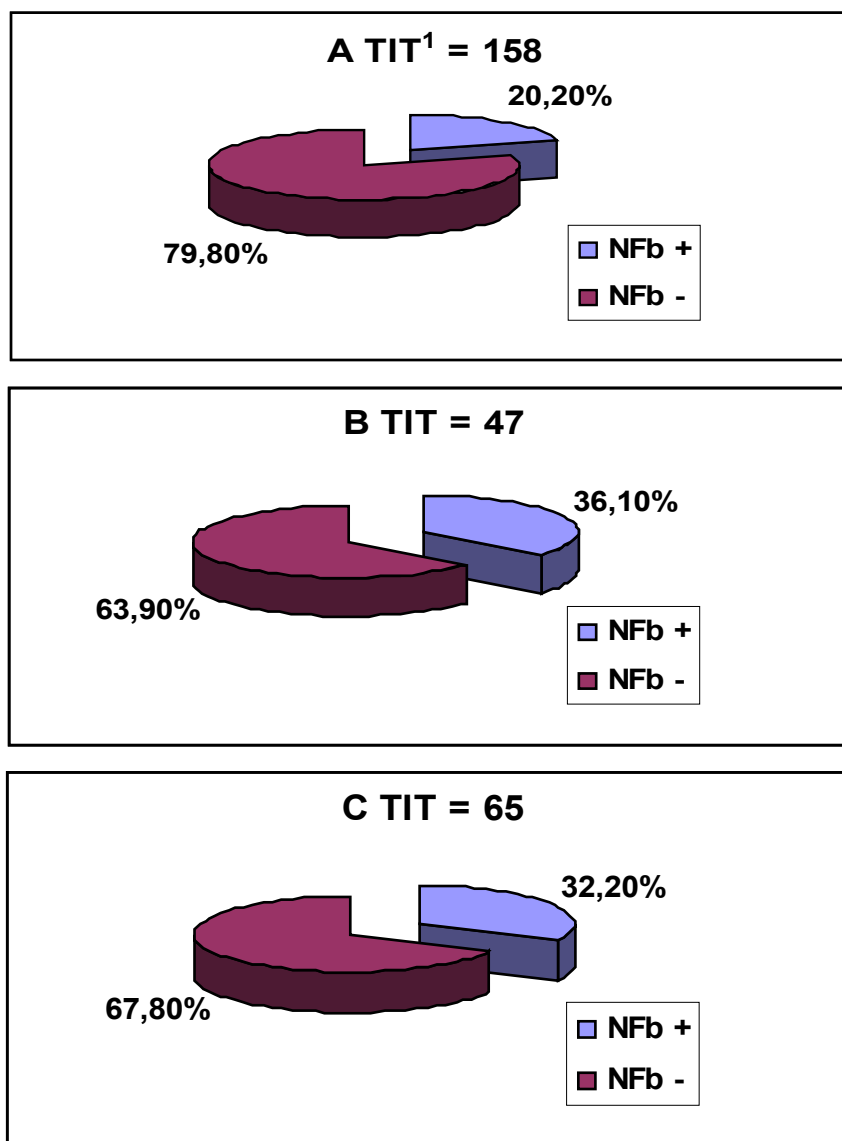


Fig.1 Crescimento das bactérias endofíticas coletadas de plantas de mandioca provenientes dos estados da Bahia (A), Amazonas (B) e São Paulo (C), em meio NFb.

¹TIT = Total de isolados testados

Muitas bactérias podem ter perdido ou reduzido a atividade da nitrogenase em consequência de repetidas repicagens em meio de cultura. As razões para isto não estão claras (Gyaneshwar et al., 2001). É possível que a habilidade para fixar N_2 atmosférico seja resultante da presença de elementos extracromossomais, como já observado para *Enterobacter agglomerans* (Singh et al., 1983).

A Tabela 1 mostra as espécies de bactérias endofíticas que cresceram em NFb e a formação de películas pelos isolados bacterianos, logo abaixo da superfície do meio. Esta formação de película era inicialmente considerada uma característica do *Azospirillum*, que devido à sua natureza microaerofílica, encontra as concentrações adequadas de oxigênio logo abaixo da superfície do meio de cultura (Tarrand et al., 1978). Estudos posteriores mostraram que outras bactérias microaerofílicas, incluindo diazotróficas, também poderiam ser isoladas em meio semi-sólido (Gillis et al., 1989).

Tabela 1. Espécies bacterianas endofíticas isoladas de plantas de mandioca provenientes dos estados do Amazonas, São Paulo e Bahia que foram NFb positivas e suas formações de películas.

Espécies bacterianas	Formação de película ¹
AMAZONAS	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-/+
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-
<i>Serratia rubidae</i>	-/+
<i>Escherichia coli</i>	-/+
<i>Burkholderia cepacia</i>	+
<i>Bacillus cereus</i>	-/+
BAHIA	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-/+
<i>Enterobacter hormaechei</i>	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-/+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-/+
<i>Bacillus cereus</i>	-/+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-/+
SÃO PAULO	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-/+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	++
<i>Bacillus pumilus</i>	-/+
<i>Bacillus cereus</i>	-/+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-/+
CONTROLE	
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	++

¹ ++ = películas finas, claras e bem visíveis; + = películas bem delineadas, mas pouco visíveis; -/+ = películas bastante claras; - = ausência de película

Películas finas, claras e visíveis, como a bactéria controle, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, foram obtidas somente nas espécies *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O gênero *Burkholderia* é também citado como diazotrófico de

mandioca, por Balota et al. (1999) e de plantas de banana e abacaxi, por Weber et al. (1999). Até o presente momento parece não existir na literatura relatos sobre a ocorrência do gênero *Stenotrophomonas* como diazotrófico na cultura da mandioca.

Bactérias do gênero *Bacillus* foram também capazes de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio. Nos estados do Amazonas e Bahia esta característica foi apenas observada em espécies de *Bacillus* do grupo *B. cereus*, enquanto que em S. Paulo ela foi também observada no *B. pumilus* e *B. megaterium*. Estes resultados corroboram aqueles descritos por Hübner (2004), que também observou o crescimento de várias espécies de *Bacillus* em meio de cultura livre de nitrogênio. Este autor relata que estes isolados foram capazes de acumular quantidades de N semelhantes àsquelas fixadas por culturas-padrão e, portanto, foram consideradas diazotróficas.

A amplificação por PCR do gene *nifH* somente foi observada em oito espécies bacterianas, pertencentes ao subgrupo das γ -*Proteobacteria* (Tabela 2). Somente a espécie *Serratia rubidae* apresentou uma banda bem visível (Figura 2); nos outros sete isolados observou-se a presença de amplicons fracos, mas dentro do tamanho dos pares de base esperados.

A diazotrofia do gênero *Serratia* é raramente demonstrada na literatura. O primeiro relato deste gênero como um diazotrófico endofítico foi feito para a espécie *S. rubidea*, isolada da endorizosfera de trigo (*Triticum aestivum*) e de *Ammophila arenaria* (Ruppel, 1988). Posteriormente, Gyaneshwar et al. (2001) isolaram a espécie *S. marcescens* como diazotrófico endofítico em arroz, embora Krishanapillai e Postgate (1980) tenham anteriormente transferido genes de *Klebsiella* envolvidos na fixação de N₂ para *S. marcescens* e mostrado que eles eram funcionais.

Tabela 2. Espécies bacterianas endofíticas isoladas de plantas de mandioca provenientes dos estados do Amazonas, Bahia e São Paulo, que apresentaram o gene *nifH*.

Espécie bacteriana endofítica	Local de isolamento
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Amazonas
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bahia
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Amazonas
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bahia
<i>Serratia rubidae</i>	Amazonas
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	São Paulo
<i>Enterobacter hormaechei</i>	São Paulo
<i>Enterobacter agglomerans</i>	São Paulo

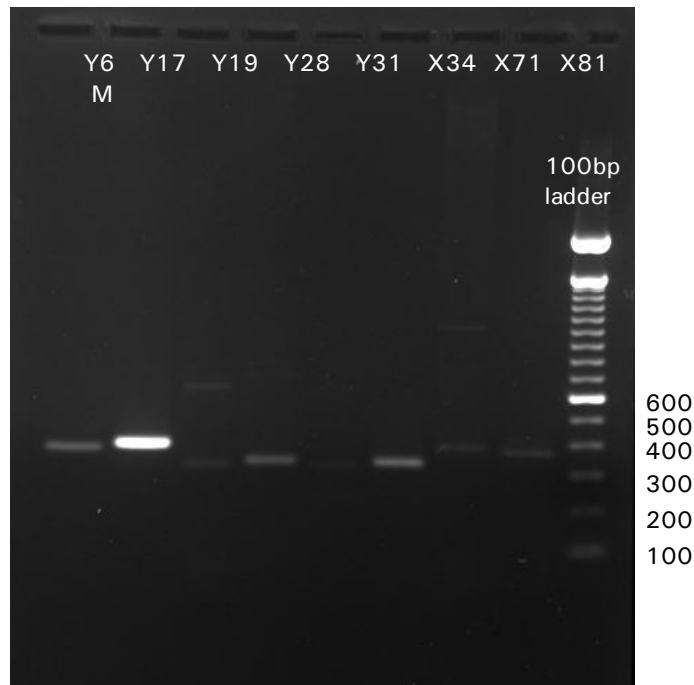


Fig.2 PCR específico para o gene *nifH*. M) Marcador 100 pb; Y6 (*Pseudomonas rhodesiae*); Y17 (*Serratia rubidae*); Y19 (*Stenotrophomonas maltophilia*); Y28 (*Enterobacter cancerogenus*); Y31 (*Pseudomonas fluorescens*); Y34 (*Klebsiella pneumoniae*); Y71 (*Enterobacter agglomerans*); Y81 (*Enterobacter hormaechei*)

Três espécies do gênero *Enterobacter* apresentaram amplicons para o gene *nifH* (*E. cancerogenus*, *E. hormaechei* e *E. agglomerans*). Este gênero é citado como diazotrófico em diferentes espécies de plantas (Mehnaz et al., 2001). Em nível de espécies podem ser citadas a *Enterobacter cloacae* (Balota et al., 1999. Mehnaz et al., 2001) e a *Enterobacter agglomerans* (Bilal et al., 1990).

Duas espécies do gênero *Pseudomonas* (*P. rhodesiae* e *P. fluorescens*) apresentaram o gene *nifH*. Várias estirpes classificadas como *Pseudomonas* spp. são relatadas na literatura como diazotróficas (Desnous et al., 2003). O gene *nifH* foi também encontrado em dois isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*; não existem na literatura relatos sobre a diazotrofia desta espécie, pelo menos em mandioca, conforme descrito anteriormente.

Foi observada alta discrepância entre a proporção de isolados bacterianos com capacidade para crescer em meio de cultura livre de nitrogênio e isolados que apresentaram reações de PCR positivas para o gene *nifH*. Como as bactérias apresentam diferentes seqüências de nucleotídeos entre e dentre diferentes espécies microbianas (Zehr et al., 2003), os isolados bacterianos que foram capazes de crescer em meio livre de nitrogênio podem possuir seqüências diferentes daquelas amplificadas com os *primers* descritos por Ueda et al. (1995) e Achouak et al. (1999).

Algumas bactérias que não foram capazes de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio apresentaram reação de PCR positiva para o gene *nifH*. Isto ocorreu com bactérias

do gênero *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Nestes casos, as bactérias podem não ter encontrado as condições adequadas para a expressão da atividade da nitrogenase. O operon *nifH*, *D* e *K* não é expressado constitutivamente e é regulado em resposta a fatores que controlam a fixação do N_2 (Zehr et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais as bactérias endofíticas poderiam aumentar o crescimento das plantas são ainda obscuros (Sessitsch et al., 2004), embora alguns estudos indiquem que o potencial dos endófitos para promover o crescimento das plantas é alto em relação aos microrganismos da rizosfera (Reiter et al., 2003). A utilização de bactérias com potencial para fixação de N_2 atmosférico é uma forma inicial de seleção dos endófitos, uma vez que tais características exigem condições adequadas para se expressarem. Silveira et al. (2004) verificaram que as espécies *Enterobacter cloacae* estirpe PEP91 e *Bacillus amyloliquefaciens* estirpe PEP81, aumentaram o crescimento de mudas de pepino, embora elas não fossem capazes de produzir ácido indolacético (AIA), ácido cianídrico (HCN) ou solubilizar fosfato em meio de cultura. Do mesmo modo, Gomes et al. (2003) observaram que as bactérias *Bacillus thuringiensis* (C25) e *B. pumilus* (C116) promoveram o crescimento de alface; nenhum destes microrganismos foram capazes de produzir AIA, HCN ou solubilizar fosfatos em testes *in vitro*. Gyaneshwar et al. (2001) relataram que a bactéria diazotrófica *Serratia marcescens*, quando inoculada na cultura do arroz, não mostrou atividade de redução do acetileno nem aumentou os teores de nitrogênio na planta. O maior crescimento das plantas inoculadas com esta bactéria foi, provavelmente, associado a outros mecanismos, que não incluíram a fixação do N_2 atmosférico. Thakuria et al. (2004) relataram que a bactéria P4 aumentou o rendimento de arroz, embora ela apresentasse baixa capacidade para solubilizar fosfato, não produzisse AIA em meio de cultura e não demonstrasse atividade da nitrogenase na rizosfera do arroz. Estes autores relataram que é difícil indicar os mecanismos responsáveis pela maior habilidade daquela bactéria para promover o crescimento da cultura. Foi discutido, porém, que a capacidade desta bactéria para solubilizar fosfato poderia ter aumentado, em condições de campo, na presença de uma comunidade microbiana complexa.

A exploração do potencial biotecnológico de um determinado organismo deverá, portanto, envolver uma série de experimentos com variações edafo-climáticas, que procurem maximizar ou comprovar o efeito benéfico do microrganismo que está sendo testado. As interações solo-planta-microrganismos são complexas e seus efeitos individuais difíceis de serem estudados. As bactérias sugeridas neste trabalho, para testes futuros, podem representar um componente importante no crescimento da mandioca nas condições em que elas foram isoladas. Devido ao pouco conhecimento dos processos interativos entre os microrganismos endofíticos e o ambiente que colonizam, na condução dos testes *in planta* com estes microrganismos, deve ser considerado o maior número possível de fatores ligados à planta (condições de sanidade, estado nutricional), ao solo (fatores físicos, químicos, microbiológicos) e às condições climáticas (ocorrência de chuvas, solos bem drenados), dentre outros.

Para a cultura da mandioca não existem trabalhos na literatura que comprovem a fixação biológica do N_2 atmosférico na planta, embora outro trabalho também tenha demonstrado a presença de bactérias endofíticas diazotróficas nesta cultura (Balota et al., 1999). Neste trabalho, os autores verificaram que a inoculação de bactérias diazotróficas em mandiocas micropropagadas não apresentou efeitos estimulatórios no crescimento da planta, quando aplicadas de forma isolada, em solo desinfestado. A inoculação conjunta com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), porém, incrementou todos os parâmetros de crescimento e nutricionais. Efeitos sinérgicos da inoculação conjunta destes dois microrganismos foram observados tanto no acúmulo de N como de P pela planta. Os efeitos benéficos dos FMA quando aplicados individualmente foram bem menores (Balota, 1995).

Conclusões

O isolamento de bactérias endofíticas de plantas de mandioca, com capacidade para fixar N_2 atmosférico *in vitro*, demonstra a presença de isolados bacterianos com potencial para aplicação biotecnológica, como promotores de crescimento da planta.

Referências Bibliográficas

- ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.961-967, 1999.
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Interações e efeitos fisiológicos de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.1335-1345, 1995.
- BALOTA, R. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1265-1276, 1999.
- BILAL, R.; RASUL, G.; MAHMOOD, K.; MALIK, K.A. Nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of *Atriplex* spp. growing in saline sodic soils of Pakistan. **Biology and Fertility of Soils**, v.9, p.315-320, 1990.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.343-350, 2001.

DESNOUES, N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; CARREÑO-LOPEZ, R.; ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, v.149, p.2251-2262, 2003.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

GILLIS, M.; KRESTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPENSTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DOBEREINER, J.; DE LAY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, p.361-364, 1989.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.4, p.701-705, 2003.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; NATARAJAN, M.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HÜBNER, A. P. **Identificação de bactérias diazotróficas endofíticas do grupo *Bacillus* associado a raízes de plantas de arroz irrigado**. 2004. 119p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. ; MENDES, I. C. Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.285-325.

KRISHNAPILLAI, V.; POSTGATE, J. R. Expression of *Klebsiella his* and *nif* genes in *Serratia marcescens*, *Erwinia herbicola* and *Proteus mirabilis*. **Archives of Microbiology**, v.127, p.115-118, 1980.

MEHNAZ, S.; MERZA, M. S.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; BANO, A.; MALIK, K.A. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.110-117, 2001.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v.83, p.137-145, 2002.

NOWAK, J.; ASIEDU, S. K.; LAZAROVITS, G.; PILLAY, V.; STEWART, A.; SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.) **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures**. Paris: Commissariat à l'Énergie Atomique, 1995. p.173-179.

REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K.; SESSITSCH, A. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, v.49, p.549-555, 2003.

RUPPEL, S. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of *Triticum aestivum* e *Ammophila arenaria*. **Developments in Soil Science**, v.18, p.253-262, 1988.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.239-249, 2004.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; NETO, E. B. S. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.217-221, 2004.

SINGH, M.; KLEEBERGER, A.; KLINGMÜLLER, W. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. **Molecular and General Genetics**, v.190, p.373-378, 1983.

STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant Soil**, v. 175, p. 257-263, 1995.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p.448-459, 2001

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A. A taxonomic study of the *Spirillum* lipoferum group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov.; and two species *Azospirillum lipoferum* (Bejerinck) sp. nov., and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.967-980, 1978.

TEIXEIRA, M.A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihotis esculenta* Crantz) coletada de diferentes regiões do Brasil**. 2004. 102p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N. C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R. C.; KHAN, M. R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v.86, p.978-985, 2004.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable n₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.1414-1417, 1995.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v.210, p.103-113, 1999.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M. STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, p.539-554, 2003.



Meio Ambiente

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

